

Espécies de *Colletotrichum* responsáveis pela gafa da oliveira em Portugal

Talhinhas, P.; Ferreira, P.; Oliveira, H.

Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

RESUMO

A gafa da oliveira, causada por *Colletotrichum* spp., é uma doença com importância crescente na região mediterrânica. Em Portugal é responsável por importantes prejuízos reflectidos na quantidade e qualidade da produção. Os objectivos deste trabalho consistiram na obtenção de uma colecção de isolados de *Colletotrichum* spp. representativa do agente ou agentes causais da doença em Portugal, assim como no esclarecimento da identidade desses isolados. Foram obtidos 40 isolados de *Colletotrichum* spp. representando 18 locais no centro e sul do país. A colecção obtida foi analisada de acordo com diversos parâmetros morfológicos (forma e dimensões dos conídios), culturais (taxa de crescimento em meio de cultura, características das colónias e resistência ao benomil), de patogenicidade (patogenicidade e virulência em azeitonas e diversos hospedeiros) e moleculares (iniciadores específicos para a região ITS do rDNA). A espécie *C. acutatum* foi identificada como predominante em azeitonas, mas a espécie *C. gloeosporioides* foi também assinalada.

Palavras-Chave: *Colletotrichum acutatum*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Olea europaea* ssp. *europaea*; gafa da azeitona; diversidade genética

ABSTRACT

Olive anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. is a disease currently becoming important in the Mediterranean region. In Portugal, the disease is responsible for important olive yield loss and poor oil quality. The objectives of this work were to establish a collection of *Colletotrichum* spp. isolates representing the causal agents of this disease in Portugal, as well as analyse the genotypic and phenotypic diversity at the species level. A total of 40 isolates were obtained representing 18 locations in the south and centre of the country. This collection was analysed according to different parameters: morphology (shape and size of conidia), culture (growth rate on PDA medium, colony characteristics and response to benomyl), pathogenicity and virulence (in olives and other hosts) and molecular data (rDNA ITS species-specific primers). The species *C. acutatum* was more commonly isolated from olives, but *C. gloeosporioides* was also identified.

Keywords: *Colletotrichum acutatum*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Olea europaea* ssp. *europaea*; olive anthracnose; genetic diversity

1. Introdução

Diversos fungos pertencentes ao género *Colletotrichum* são responsáveis por doenças importantes em várias culturas agrícolas. Na oliveira, a importância da gafa tem sido crescente nos últimos anos na região mediterrânica. Os sintomas mais frequentes associados a esta doença são lesões enegrecidas, geralmente em depressão, com produção abundante de massas mucilaginosas alaranjadas de conídios, originando intensa queda de frutos. Em Portugal esta doença é muito comum, originando perdas de até 100% sobretudo na cultivar susceptível 'Galega' (que representa 85% da área cultivada em Portugal). Tanto a espécie *Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds como *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. estão associadas à doença (Martín e García-Figueres, 1999), mas com pouca informação disponível no que se refere à sua importância relativa e à diversidade intraespecífica. Outros aspectos epidemiológicos e de patogenicidade relevantes são pouco conhecidos, tais como as vias de sobrevivência do inóculo entre anos, o potencial para infecções cruzadas ou as formas de colonização dos tecidos (colonização biotrófica e/ou necrotrófica). A utilização conjugada de diferentes estudos moleculares, culturais, morfológicos e de patogenicidade permitiu anteriormente estudar a diversidade inter- e intraespecífica de *Colletotrichum* spp. infectando *Lupinus* spp. (Talhinhas *et al.*, 2002).

Os objectivos deste trabalho consistiram na obtenção de uma colecção de isolados de *Colletotrichum* spp. representativos do agente causal da gafa em Portugal, assim como estabelecer inequivocamente a identidade desses isolados.

2. Materiais e Métodos

A obtenção de isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de gafa da azeitona foi feita na sequência de missões conduzidas no Inverno de 2001/02 dirigidas às principais regiões olivícolas do centro e sul de Portugal (Figura 1). Os isolados em estudo foram comparados com isolados-referência (Sreenivasaprasad *et al.*, 1992; Talhinhas *et al.*, 2002) para *C. acutatum* – isolados 20 (morangueiro, Portugal), 30 (tremoceiro, Açores, Portugal) e 47 (nespereira, Portugal) – e para *C. gloeosporioides* – isolados 21 (limoeiro, Portugal) e 85 (morangueiro, E.U.A.).

Estes isolados foram analisados recorrendo a diversos parâmetros morfológicos (forma e dimensões dos conídios), culturais (taxa de crescimento em meio de cultura, características das colónias e resistência ao benomil), de patogenicidade (patogenicidade em azeitonas e outros hospedeiros: plantas de tremoceiro e de morangueiro e em morangos destacados) e moleculares (iniciadores específicos para a região ITS do rDNA), recorrendo a metodologia descrita anteriormente (Talhinhas, 2002; Talhinhas *et al.*, 2002). Adicionalmente estudaram-se características morfológicas em meio de cultura SNA (Nirenberg, 1990). A inoculação de frutos destacados foi feita recorrendo a injeção de 20 µl duma suspensão de 1×10^5 esporos.cm⁻³ sob a epiderme de frutos previamente lavados com 0,1% NaClO, sendo estes incubados em cristizador (100% HR) à temperatura ambiente ($\approx 21^\circ\text{C}$), e os sintomas observados ao fim de 7 dias para morangos, 11 dias para azeitonas e 44 dias para pêssegos. A inoculação de plantas de tremoceiros e morangueiros foi realizada de forma idêntica à descrita anteriormente (Talhinhas, 2002).

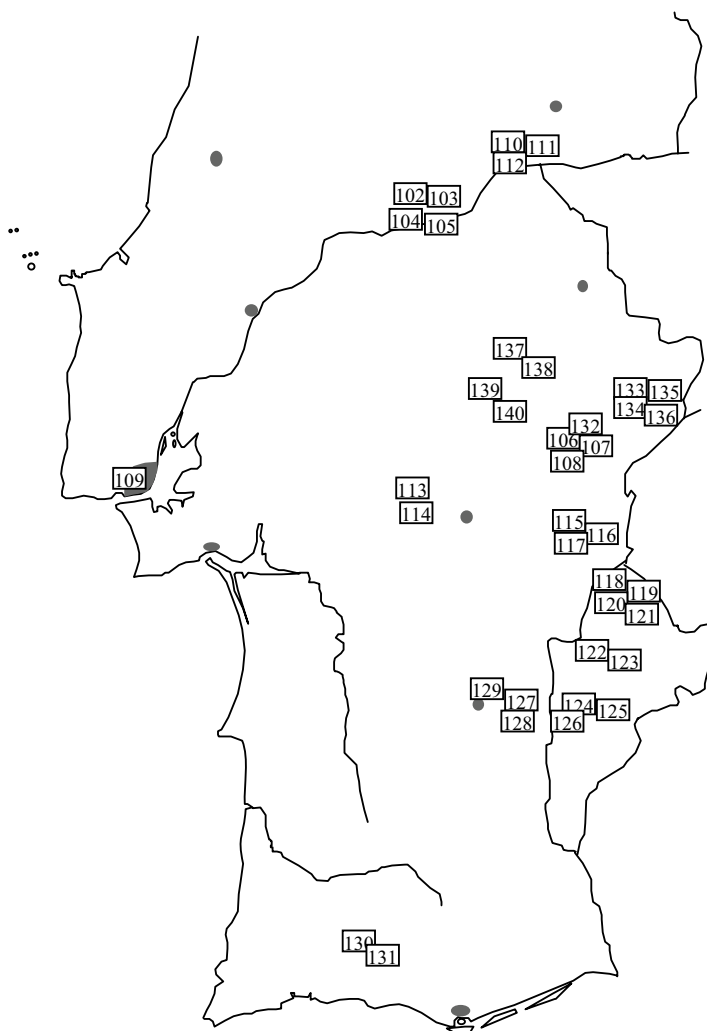


Figura 1 – Origem geográfica (centro e sul de Portugal) dos isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de oliveira.

3. Resultados

3.1. Prospeção de campo

Foi possível identificar azeitonas exibindo sintomas típicos de gafa na quase totalidade dos olivais visitados, tal como exemplificado na Figura 2. Foi obtida uma colecção de 40 isolados, referenciados com os números 102-141.



Figura 2 – Azeitona (“Bical”) obtida em Novembro de 2001 no concelho de Abrantes exibindo sintomas típicos de gafa: lesão necrótica em depressão com abundantes massas mucilaginosas laranjas.

3.2. Caracterização cultural

O estudo do crescimento micelial em meio de cultura (Potato Dextrose Agar – PDA, Difco) durante 5 dias a 25°C na obscuridade permitiu distinguir dois grupos de isolados: grupo A, formado pela quase totalidade dos isolados de azeitonas e incluindo os isolados-referência para *C. acutatum* (crescimento micelial de 1,8-4,5 cm); grupo B, formado pelos isolados-referência de *C. gloeosporioides* e pelo isolado 111 de azeitona (Vila Velha de Ródão) (crescimento micelial de 5,2-6,2 cm). A diferenciação entre estes dois grupos foi também posta em evidência ao estudar o crescimento micelial em PDA contendo 2 mg.dm⁻³ benomil (Benlate), verificando-se total inibição de crescimento micelial para os isolados do grupo B e apenas parcial para os do grupo A.

3.3. Caracterização morfológica

A análise das dimensões dos conídios revelou a existência de reduzidas diferenças estatisticamente significativas, variando o comprimento entre 7,7-12,7 µm e a largura entre 2,8-4,5 µm para esporos produzidos em colónias cultivadas em PDA, sendo o comprimento de 12,4-15,0 µm e a largura de 3,2-4,5 µm em meio de SNA.

3.4. Caracterização molecular

A amplificação do DNA dos isolados em estudo por PCR, com recurso a iniciadores específicos para as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, originou (Figura 3) a síntese dum fragmento de cerca de 490 pb na presença do iniciador CaInt2 (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996), específico para *C. acutatum*, para os isolados-referência 20, 30 e 47 e para todos os isolados obtidos de oliveira, com excepção do isolado 111. Pelo contrário, a amplificação PCR na presença do iniciador CgInt (Mills *et al.*, 1992), específico para *C. gloeosporioides*, originou a produção dum fragmento de cerca de 450 pb para os isolados-referência desta espécie (21 e 85) e para o isolado 111. O controlo negativo não originou qualquer fragmento.

Estes resultados coincidem com os grupos (A e B) obtidos nos ensaios de caracterização cultural.

3.5. Caracterização da patogenicidade

Todos os isolados analisados mostraram-se patogénicos em todos os hospedeiros testados. Em azeitonas, mantidas em condições de humidade saturante, foi possível obter abundante esporulação e com frequência intensa produção de micélio, cerca de uma semana após a inoculação, mesmo para os isolados-referência, obtidos de outros hospedeiros (Figura 4).

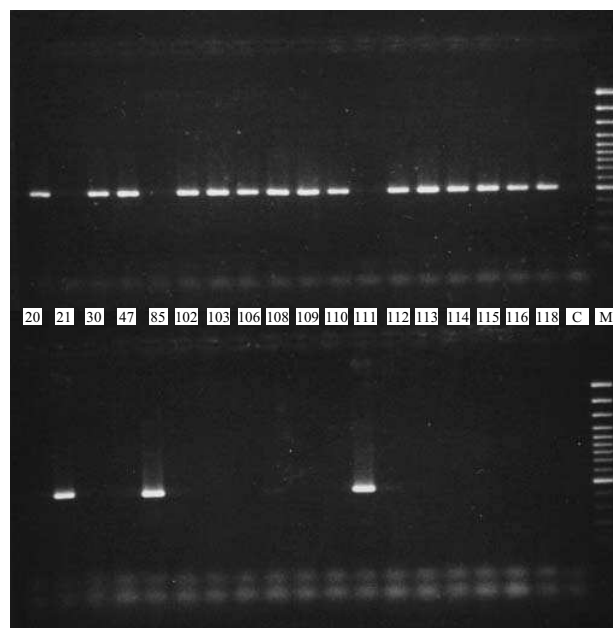


Figura 3 – Separação em gel de agarose dos produtos de amplificação obtidos por PCR com iniciadores específicos para alguns dos isolados de *Colletotrichum* spp. em estudo, na presença de iniciador específico para *C. acutatum* (metade superior) e para *C. gloeosporioides* (metade inferior); 20, 30 e 47 – controlos positivos para *C. acutatum*; 21 e 85 – controlos positivos para *C. gloeosporioides*; C – controlo negativo; M - marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp, MBI Fermentas).

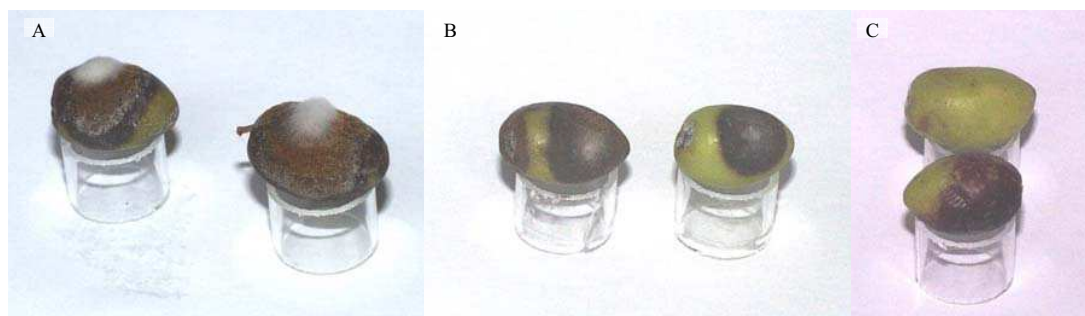


Figura 4 – Azeitonas (“Verdeal”), injectadas com suspensão de esporos de *Colletotrichum acutatum* (A, isolado 140 obtido de oliveira; B, isolado 20 obtido de morangueiro) ou com água destilada esterilizada (C, controlo negativo), após 11 dias de incubação a $\approx 21^\circ\text{C}$ e a 100% HR. Nota: a mancha escura num dos frutos da foto C resulta do processo de maturação fisiológica do fruto (mudança de cor).

De igual forma, os isolados obtidos em oliveira revelaram-se patogénicos noutros hospedeiros. Em morangueiros, a injeção duma suspensão de esporos de *Colletotrichum* spp. sob a epiderme do fruto originou, para todos os isolados em estudo, lesões necróticas em depressão, onde surgiram massas mucilaginosas de cor laranja e, frequentemente, abundante micélio aéreo cinzento-esbranquiçado (Figura 5).

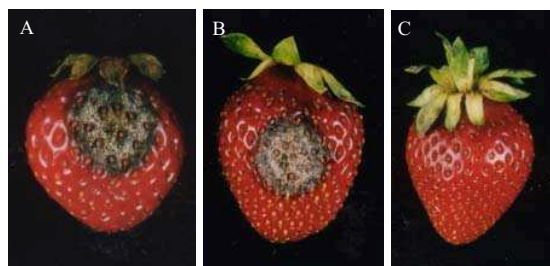


Figura 5 – Morangos, injectados com suspensão de esporos de *Colletotrichum acutatum* (A, isolado 140 obtido de oliveira; B, isolado 20 obtido de morangueiro) ou com água destilada esterilizada (C, controlo negativo), após 7 dias de incubação a $\approx 21^{\circ}\text{C}$ e a 100% HR.

Em plantas de morangueiro e de tremoeiro os isolados em estudo (nomeadamente os obtidos de oliveira) originaram lesões necróticas nos pecíolos, caules/estolhos e cotilédones, assim como nas folhas (Figura 6), tendo sido reisolado o agente previamente inoculado.

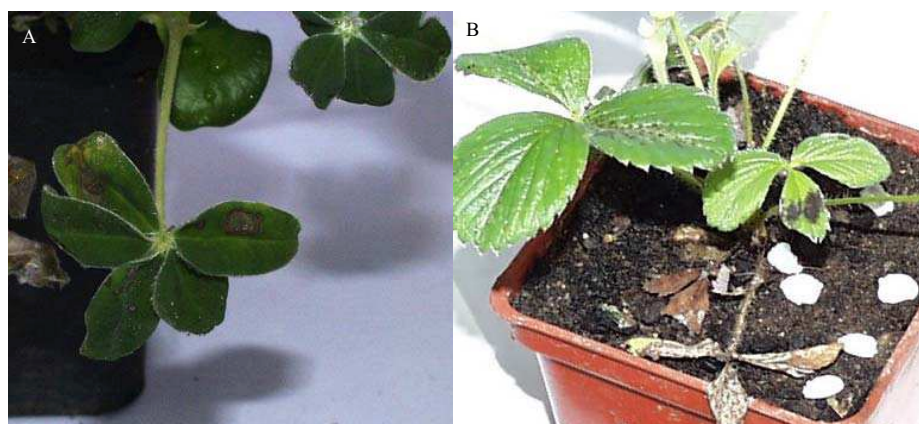


Figura 6 – Planta de tremoeiro (A) e de morangueiro (B), inoculadas por pulverização com uma suspensão de esporos de *Colletotrichum acutatum* isolados de oliveira (isolados 110 e 130 respectivamente), após 11 dias de incubação em condições de humidade saturante.

4. Discussão

O recurso a diferentes metodologias para caracterização e comparação dos isolados de *Colletotrichum* sp. obtidos de azeitona com sintomas de gafa permitiu identificar a quase totalidade destes com a espécie *C. acutatum*, sendo apenas o isolado 111 (obtido em Vila Velha de Ródão em azeitonas da cultivar “Bical”) identificado com a espécie *C. gloeosporioides*. A utilização de PCR com iniciadores específicos para cada uma destas espécies revelou-se bastante útil para esta distinção. Ainda assim, a análise do crescimento das colónias em meio de cultura, e em particular a sensibilidade destas ao benomil, permitiu a separação dos isolados em estudo em dois grupos distintos, onde se incluem os isolados-referência para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, e originando valores semelhantes aos obtidos anteriormente na distinção entre estas espécies (Lardner *et al.*, 1999; Talhinhos *et al.*, 2002). Já a análise da morfologia dos

conídiolos se revelou menos informativa que noutros estudos (Denoyes e Baudry, 1995; Talhinhos, 2002).

A inoculação de plantas de tremoceiro com isolados obtidos de oliveira originou significativos sintomas nas folhas, situação pouco frequente com isolados oriundos de outros hospedeiros, tal como verificado anteriormente (Talhinhos, 2002). Este facto deverá merecer análise mais aprofundada. Aliás, a patogenicidade verificada com isolados de diferentes origens em relação aos diversos hospedeiros analisados alerta para o potencial de infecção cruzada destes fungos, o que é relevante tanto na perspectiva da protecção das plantas, como na perspectiva do estudo da evolução genética e especialização patogénica destes fungos.

Assim, também em território português foi possível isolar as espécies *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* associadas à gafa da azeitona, tal como verificado anteriormente em Espanha (Martín e García-Figueres, 1999). A frequência relativa com que isolados de cada uma destas espécies foi encontrada neste estudo endereça maior relevo a *C. acutatum*, mas será necessário proceder a este estudo em diversos anos e num maior número de locais, por forma a perceber com mais detalhe a importância relativa destas espécies como agentes causais da gafa da azeitona. A análise dos níveis de diversidade genética intra-específica entre os isolados associados à gafa da azeitona, actualmente em curso, permitirá aprofundar os resultados aqui apresentados.

Referências Bibliográficas

- Denoyes, B. & Baudry, A. 1995. Species identification and pathogenicity study of french *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology* 85: 53-57.
- Lardner, R.; Johnston, P.; Plummer, K. & Pearson, M. 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. *Mycol. Res.* 103: 275-285.
- Martín, M. & García-Figueres, F. 1999. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 733-741.
- Mills, P.R.; Sreenivasaprasad, S. & Brown, A.E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 98: 137-144.
- Nirenberg, H.I. 1990. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Stud. Mycol.* 32: 92-101.
- Sreenivasaprasad, S.; Brown, A.E. & Mills, P.R. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 41: 265-281.
- Sreenivasaprasad, S.; Sharada, K.; Brown, A.E. & Mills, P.R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathol.* 45: 650-655.
- Talhinhos, P. 2002. Caracterização de germoplasma do género *Lupinus*, avaliação da resistência à antracnose e estudo da diversidade e taxonomia do agente causal (*Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds). Tese de Doutoramento em Engenharia Agrónoma. Instituto Superior de Agronomia (UTL), Lisboa.
- Talhinhos, P.; Sreenivasaprasad, S.; Neves-Martins, J. & Oliveira, H. 2002. Genetic and morphological characterisation of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology* 92: 986-996.